

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791655

研究課題名（和文）脊髄損傷における TROY の役割の解明と中枢神経再生治療への応用

研究課題名（英文）The role of TROY after the spinal cord injury and application of TROY for the treatment of injuries of the central nervous system.

研究代表者

久岡 朋子 (HISAOKA TOMOKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00398463

研究成果の概要（和文）：まず生理的条件下の脊髄における TROY 蛋白の発現、及び局在を検討した。その結果、TROY は胎生期には Nestin 陽性、GLAST 陰性の脊髄背側の神経前駆細胞/放射状グリア細胞に発現し、生後は GFAP、及び S100 陽性のアストロサイトに発現していることが判明した。次に脊髄背側半切断モデルを作成し、損傷 1、3、7、14、21 日後の損傷部における TROY の発現を検討した結果、損傷 3 日後の損傷部周囲に限局して少数の細胞にのみ発現が認められた。これらの結果より TROY は主に発達過程の脊髄背側の神経前駆細胞/放射状グリア細胞、及びアストロサイトの発生に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：First, we investigated the expression pattern of TROY in the developing and adult spinal cord. TROY was expressed in the nestin-positive, GLAST-negative neural progenitor/radial glial cells in the spinal cord during embryonic stages. During postnatal stages, TROY was exclusively expressed in the GFAP- or S100-positive astrocytes in the spinal cord. Next, we investigated the expression of TROY in the spinal cord after dorsal hemisection of the spinal cord. A few TROY-positive cells were observed around the injury site. These results suggest that TROY may be involved in the development of dorsal subpopulation of neural progenitor/radial glial cells and astrocytes in the spinal cord.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：再生医学、脊髄損傷、サイトカイン、グリア癒痕、嗅神経被覆グリア

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷や脱髄疾患などの中枢神経系の傷害では、重篤な機能障害が残存し、その治療は困難である。中枢神経の再生が阻害される原因として、髄鞘に存在する神経再生阻害因子（ミエリン関連蛋白の Nogo、MAG、OMgp や反発性ガイダンス分子の Semaphorin 4D、

ephrin B3）や、傷害部に形成されるグリア癒痕、及びグリア癒痕に由来するサイトカイン（IL-6）や神経再生阻害因子（Semaphorin 3A、ephrin B2）等が報告されている。これらのことから、その治療法として、ミエリン関連蛋白（Nogo、MAG、OMgp）やサイトカイン（IL-6）に対する中和抗体・受容体阻害剤、Sema3A 阻

害剤などの投与、及び嗅神経被覆グリア (olfactory ensheathing cells; OECs) の細胞移植等が行われ、ある程度の効果が報告されてきた。また、神経細胞や神経幹細胞の移植による治療効果も報告されている。しかし、より効果的な治療法の開発のために、詳細な病態と治療メカニズムの解明が必要とされている。

我々がこれまで研究してきた TNFR スーパーファミリーのメンバーである TROY は、神経再生阻害因子である Nogo のレセプター (NgR) の co-receptor としての役割が報告され、注目されてきた。我々は、TROY の脳発生過程での発現パターンとその機能解析結果 (Hisaoka et al., Brain Res Dev Brain Res, 2003; Hisaoka et al., Eur J Neurosci, 2006) から、TROY 固有のリガンドを探索してきたが、2年前に LT- $\alpha$  が TROY 固有のリガンドとして毛包の発生に関与することが報告された。LT- $\alpha$  は脱髄モデルマウスにおいて傷害部位のグリア瘢痕に発現していることが知られている。一方、TROY も成獣マウスの脳においてアストロサイトに広く発現し、脱髄疾患のヒトの脳においてもグリア瘢痕や神経細胞における発現が認められている。しかし、生理的条件下、及び脊髄損傷後の脊髄における TROY や LT- $\alpha$  の発現や機能に関しては未だ不明である。

また、脊髄損傷部位へ移植される OECs はその形態、発現分子により、p75 陽性のシュワン細胞様 OECs (Sc-OECs) と p75 陰性のアストロサイト様 OECs (As-OECs) の 2 種類に分けられるが、これらの OECs の損傷部位での動態はいまだ一定の見解が得られておらず、その分子メカニズムに関しても多くが不明である。TROY は発達過程、及び成獣マウスの嗅覚系において、As-OECs に発現している (Hisaoka et al., Glia, 2004)。一方、LT- $\alpha$  はグリア瘢痕の反応性アストロサイトに発現している可能性があることから、LT- $\alpha$  が TROY を介して As-OECs のグリア瘢痕への移動を誘導している可能性が考えられる。本研究では、As-OECs における TROY シグナルとその機能を明らかにすることにより、OECs の新しい機能とそれによる損傷神経修復メカニズムの解明をめざす。

## 2. 研究の目的

(1) 生理的条件下の成獣、及び発達過程の脊髄における TROY とそのリガンドの発現と役割を検討する。

(2) 脊髄損傷モデルを作成し、損傷部におけるグリア細胞の動態と TROY の発現を検討する。

これらの解析により、生理的条件下、及び脊髄損傷後の脊髄における TROY の役割を解明し、TROY を用いた新たな脊髄損傷治療法開

発の手がかりを得ることが期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) 成獣マウス脊髄における TROY とそのリガンドの発現の検討、及び発現細胞の同定

成獣マウス脊髄より凍結切片を作成し、TROY、及び LT- $\alpha$  の発現をこれらに対する抗体を用いて免疫染色法で検討した。さらに、TROY、及び LT- $\alpha$  発現細胞を各種細胞のマーカーとの二重免疫染色法により同定した。

(2) マウス脊髄における TROY の役割の検討

TROY の機能抑制を目的として、可溶性の TROY とヒト IgG の Fc 部とのキメラ蛋白 (sTROY-Fc) を過剰発現させたトランスジェニックマウス (sTROY-Fc Tg マウス) を作成しており、脊髄の TROY 発現細胞を中心に、各種細胞における異常の有無をヘマトキシリン・エオジン染色法により組織学的に検討した。

(3) 発達過程のマウス脊髄における TROY の発現の検討

胎生 8.5、9.5、11.5、12.5、13.5、15.5、17.5 日齢、及び生後 0、7、14、21 日齢のマウス脊髄より凍結切片を作成し、TROY の発現を免疫染色法で検討した。

(4) 発達過程のマウス脊髄における TROY 発現細胞の同定

胎生 12.5、15.5 日齢、及び生後 7、14 日齢のマウス脊髄より凍結切片を作成し、TROY 発現細胞を各種細胞のマーカーとの二重免疫染色法により同定した。

(5) マウス脊髄損傷モデルの確立と脊髄損傷部位における TROY の発現の検討

イソフルラン麻酔下で第 10 胸椎の椎弓を切除し、第 10 胸椎の脊髄背側をマイクロシザーにて切断し、マウス脊髄背側半切断モデルを確立した。

脊髄損傷 1、3、7、14、及び 21 日後に還流固定を行い、脊髄より凍結切片を作成した。損傷部位のグリア瘢痕における反応性アストロサイトの検出に glial fibrillary acidic protein (GFAP)、脱髄部位の検出に myelin basic protein (MBP) に対する抗体を用いて免疫染色法で検討した。またグリア瘢痕における TROY の発現を GFAP 及び TROY に対する抗体を用いた二重免疫染色法で検討した。

## 4. 研究成果

(1) 成獣マウス脊髄における TROY と LT- $\alpha$  の発現の検討、及び TROY 発現細胞の同定

成獣の脊髄内において TROY の弱い発現が認められた。TROY 発現細胞の同定のために、

神経細胞、アストロサイト、ミクログリアのマーカーである NeuN、GFAP/S100、Iba-1 に対する抗体と抗 TROY 抗体との二重免疫染色を行ったところ、アストロサイトのマーカーである GFAP、及び S100 とのみ共存を認めた (図 1)。

また、LT- $\alpha$  に対する抗体を用いて、LT- $\alpha$  蛋白の発現を検討した結果、脊髄内で広範囲に発現を認めた。

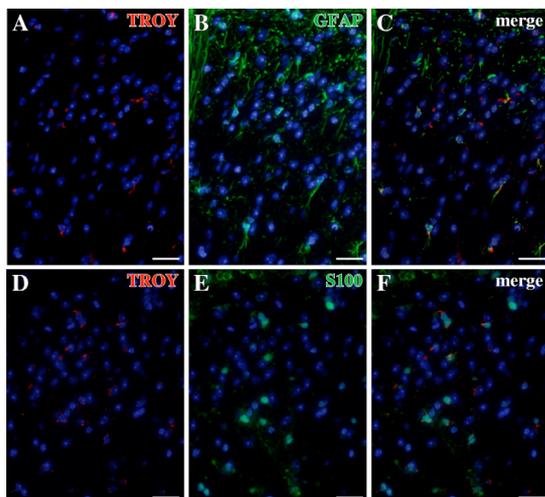


図 1 成獣脊髄における TROY (A, D) と GFAP (B)、及び S100 (E) との二重免疫染色像。図 C, F は図 A, B、及び図 D, E の重ね合わせ像。スケールバー = 50  $\mu$ m (A-F)。

## (2) 成獣マウス脊髄における TROY の役割の検討

生理的条件下の脊髄アストロサイトにおいて TROY の発現が認められたことから、脊髄損傷部のグリア瘢痕における TROY の役割を解析する前段階として、生理的条件下のアストロサイトにおける TROY の役割を解析することが必要かつ重要であると考えられた。そこで、TROY からのシグナルの抑制を目的として、可溶性の TROY とヒト IgG の Fc 部とのキメラ蛋白 (sTROY-Fc) を過剰発現させたトランスジェニックマウス (sTROY-Fc Tg マウス) を用いて、肉眼的、及び組織学的に脊髄での異常の有無を検討した。その結果、脊髄において肉眼的な異常はみられず、またヘマトキシリン・エオジン染色法による組織学的検索においても脊髄の組織構築に明らかな異常は検出されなかった (図 2)。

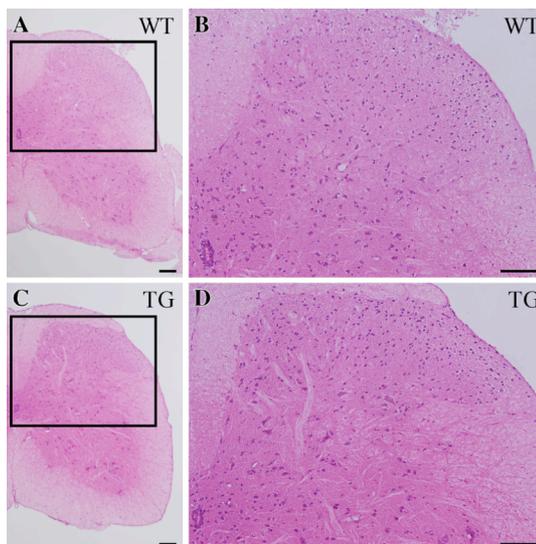


図 2 野生型 (A, B)、及び sTROY-Fc Tg マウス (C, D) の成獣脊髄のヘマトキシリン・エオジン染色像。図 B, D は図 A, C の四角で囲った部分の拡大像。スケールバー = 100  $\mu$ m (A-D)。

## (3) 胎生期・生後のマウス脊髄における TROY の発現

TROY に対する抗体を用いて、発達過程の脊髄における TROY 蛋白の発現、及び局在を検討した。その結果、胎生 8.5 日齢の脊髄の主に背側脳室帯の大部分において、強い TROY の発現を認め、胎生 9.5 日齢から 13.5 日齢においても脊髄背側の脳室帯における発現が持続していた。胎生 11.5 日齢から 13.5 日齢では脊髄背側の脳室帯から放射状に脳軟膜へ移動する細胞にも TROY の発現を認めた (図 3)。

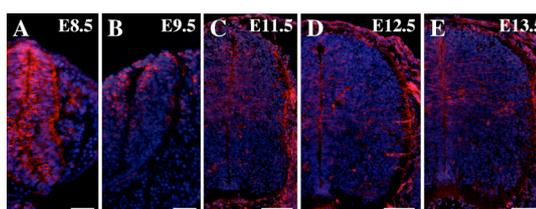


図 3 胎生 8.5 日齢 (A)、9.5 日齢 (B)、11.5 日齢 (C)、12.5 日齢 (D)、及び 13.5 日齢 (E) における TROY 蛋白の発現。スケールバー = 200  $\mu$ m (A, B); 100  $\mu$ m (C-E)。

胎生 15.5 日齢から生後 0 日齢にかけて、脊髄背側のごく一部の細胞に TROY の発現を認めた (図 4)。

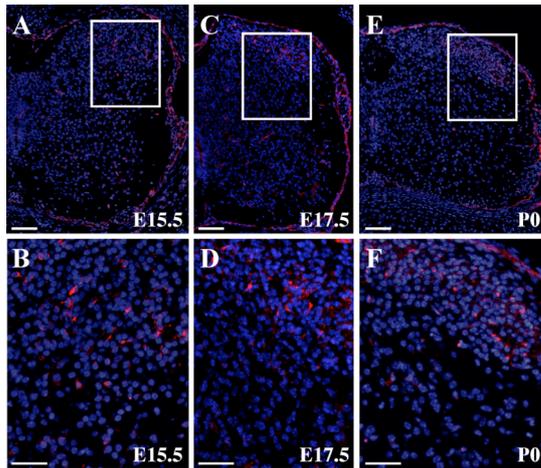


図4 胎生 15.5 日齢(A, B)、17.5 日齢(C, D)、及び生後 0 日齢(E, F)の脊髄における TROY 蛋白の発現。図 B, D, F は図 A, C, E の四角で囲った部分の拡大像。スケールバー = 200  $\mu\text{m}$  (A, C, E); 100  $\mu\text{m}$  (B, D, F)。

生後 7 日齢から 14 日齢にかけて、TROY 発現細胞は脊髄全体に広く認められるようになり、一細胞あたりの TROY 発現レベル、及び TROY 発現細胞数が増加し、14 日齢でピークとなった(図 5)。生後 14 日齢から 21 日齢にかけて一細胞あたりの TROY 発現レベル、及び TROY 発現細胞数は減少していき、21 日齢では成獣と同レベルにまで低下した。

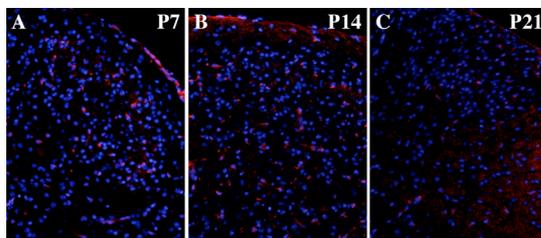


図 5 生後 7 日齢(A)、14 日齢(B)、及び 21 日齢(C)の脊髄における TROY 蛋白の発現。スケールバー = 100  $\mu\text{m}$  (A-C)。

### (3) 胎生期・生後のマウス脊髄における TROY 発現細胞の同定

胎生期における TROY 発現細胞の同定のため、胎生 12.5 日齢の脊髄において、TROY と神経前駆細胞/放射状グリアのマーカーである nestin、及び神経細胞のマーカーである  $\beta$ III-tubulin との二重免疫染色を行った。その結果、TROY は nestin 陽性の神経前駆細胞/放射状グリアに発現し、 $\beta$ III-tubulin 陽性の神経細胞には発現していなかった(図 6)。

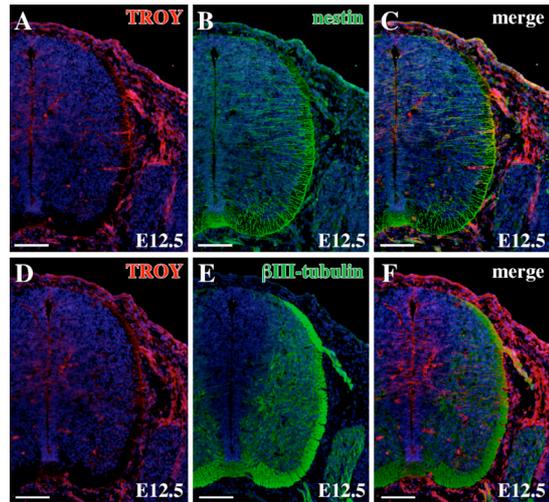


図 6 胎生 12.5 日齢の脊髄における TROY (A, D) と nestin (B)、及び  $\beta$ III-tubulin (E) との二重免疫染色像。図 C, F は図 A, B、及び図 D, E の重ね合わせ像。スケールバー = 100  $\mu\text{m}$  (A-F)。

さらに、胎生 12.5 日齢の脊髄の脳室帯において、TROY は背側の nestin 陽性の神経前駆細胞に主に発現していたため、腹側の神経前駆細胞に発現することが知られている Pax6 と TROY との二重免疫染色を行った。その結果、Pax6 陽性細胞と TROY 陽性細胞で境界領域(矢印)を形成し、共存は認めなかった(図 7)。

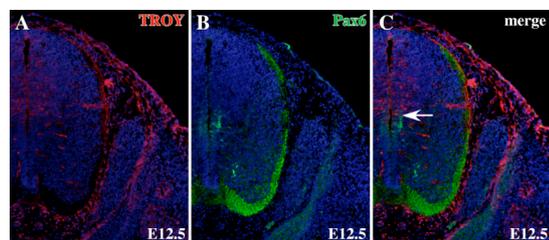


図 7 胎生 12.5 日齢の脊髄における TROY (A) と Pax6 (B) との二重免疫染色像。図 C は図 A, B の重ね合わせ像。矢印は TROY 陽性細胞と Pax6 陽性細胞との境界領域を示す。スケールバー = 100  $\mu\text{m}$  (A-C)。

さらに、胎生 12.5 日齢の脊髄腹側の放射状グリアに発現することが知られている GLAST と TROY との二重免疫染色を行った結果、GLAST と TROY との共存は認めず、相補的な発現パターンを示した(図 8)。胎生 12.5 日齢の脊髄背側の放射状グリアは GLAST 陰性で、まだ神経新生の時期にある(神経原性である)ことが報告されているが、腹側の GLAST 陽性の放射状グリアはグリア原性である可能性が示唆されている。これらのことから、TROY はグリア原性放射状グリアではなく、よ

り未分化な放射状グリアか、神経原性放射状グリアに発現している可能性が考えられる。

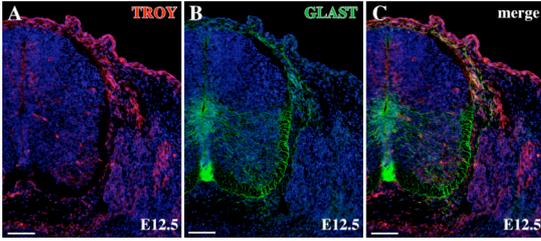


図8 胎生 12.5 日齢の脊髄における TROY (A) と GLAST (B) との二重免疫染色像。図 C は図 A, B の重ね合わせ像。スケールバー = 100 μm (A-C)。

また、生後 7 日齢、及び 14 日齢の脊髄において TROY とアストロサイトのマーカーである GFAP、S100 (図 9)、及び神経細胞のマーカーである NeuN (図 10) との二重免疫染色を行った。その結果、生後 7 日齢、及び 14 日齢の脊髄アストロサイトの大部分に TROY の発現を認め、神経細胞には TROY は発現していなかった。

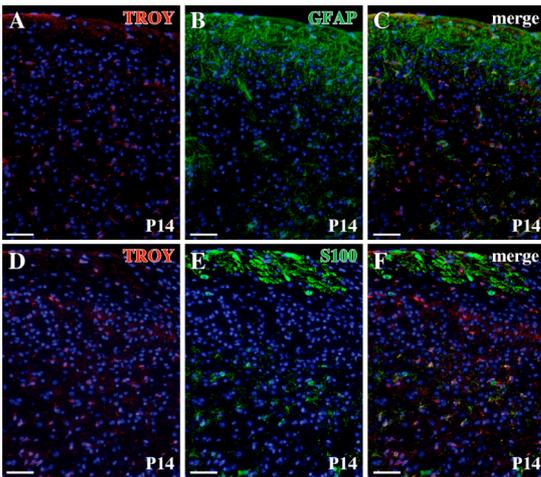


図9 生後 14 日齢の脊髄における TROY (A, D) と GFAP (B)、及び S100 (F) との二重免疫染色像。図 C, F は図 A, B、及び図 D, E の重ね合わせ像。スケールバー = 100 μm (A-F)。

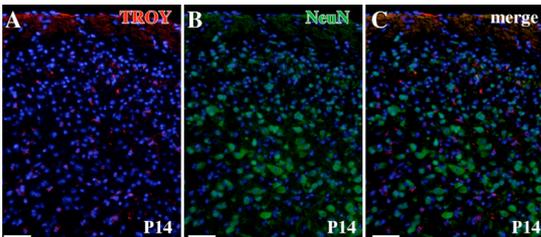


図10 生後 14 日齢の脊髄における TROY (A) と NeuN (B) との二重免疫染色像。図 C は図 A, B の重ね合わせ像。スケールバー = 100 μm (A-C)。

(5) 脊髄損傷部位における TROY の発現の検討  
脊髄背側半切断モデルを作成し、損傷 1、3、7、14、及び 21 日後の損傷部、及びグリア瘢痕における TROY の発現を検討した。損傷 7 日後から 21 日後において、GFAP 陽性のアストロサイトを含むグリア瘢痕の形成が認められたが、TROY の発現は認められなかった (図 11)。TROY の発現は損傷 3 日後の損傷部周囲の少数の細胞においてのみみられた (図 11)。

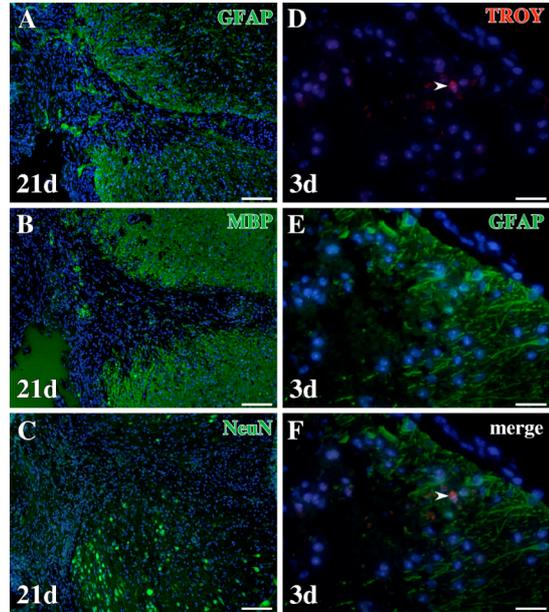


図11 脊髄損傷 21 日後のグリア瘢痕における GFAP (A)、MBP (B)、及び NeuN (C) の免疫染色像と脊髄損傷 3 日後の損傷部位における TROY (D, F、矢尻) と GFAP (E) との二重免疫染色像。図 F は図 D, E の重ね合わせ像。スケールバー = 100 μm (A-C); 50 μm (D-F)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久岡 朋子 (HISAOKA TOMOKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00398463

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：